



HR-03100049

22 APR 2004 (22-04-2004)
Rec'd PCT/PTO 28 APR 2005

REPUBLIKA HRVATSKA
DRŽAVNI ZAVOD ZA INTELKTUALNO VLASNIŠTVO

REC'D 05 MAY 2004

WIPO

PCT

SVJEDODŽBA O PRAVU PRVENSTVA PRIORITY CERTIFICATE

Državnom zavodu za intelektualno vlasništvo podnesena je prijava patenta s podacima kako slijedi:
The State Intellectual Property Office received the patent application containing the following indications:

(71) Ime(na) podnositelja prijave ili tvrtka i sjedište: / *Name(s) of applicants:*

Vladimir Leko
Istarska 7
34000 Požega, HR

(22) Datum podnošenja prijave patenta: / *Date(s) of filing of the application(s):* 29.10.2002.

(21) Broj prijave patenta: / *Number(s) assigned to the application:* P20020858A

(54) Naziv izuma: / *Title of the invention:*

POSTUPAK IZOLACIJE SILIMARINA I ULJA IZ PLODOVA BILJKE SIKAVICE

Ovime se potvrđuje da su navedeni podaci kao i prilog istovjetni s izvornikom.
This is to certify that the enclosed data are identical to the original.

BEST AVAILABLE COPY



Pomoćnik ravnatelja:
Ivan Bagja, dipl. ing.

U Zagrebu, 2.04.2003.

Klasa: U-10-08-10/0049
Ur. br.: 514-04

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

REPUBLIC OF CROATIA
STATE INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

POSTUPAK IZOLACIJE SILIMARINA I ULJA IZ PLODOVA BILJKE SIKAVICE

OPIS IZUMA

- 5 Silimarin je trivijalni naziv za složenu smjesu spojeva: silibina, izosilibina, silidianina, silikristina, taksifolina, dehidrodikoniferilalkohola i kvercetina a najznačajniji prirodni izvor je plod sikavice (*Silybum marianum*). Silimarin je pokazao izrazito hepatoprotektivno djelovanje te je značajna aktivna supstancija brojnih biljnih lijekova. Najznačajnija komponenta silimarina je silibin dok su ostale prisutne u manjim udjelima. Većina radova iz područja farmakologije silimarina odnosi se na djelovanje cjelokupne smjese dok se o pojedinačnim aktivnostima komponenta silimarina ne zna mnogo. Iz tog razloga proizvodnja silimarina usmjerena je ka što kvantitativnijoj izolaciji iz plodova sikavice i preradi u stabilan kristalinični oblik. Takvi silimarinu pogodni su za proizvodnju različitih farmaceutskih oblika u domeni biljnih lijekova ili dijetetike.
- 10
- 15 Prema postupku opisanom u patentu US 6 309 678 izolacija silimarina uključuje hlađenje ploda sikavice do -20°C da bi se provelo mljevenje. Samljevena sikavica ekstrahira se *n*-heksanom radi deoleinizacije. Nakon toga deoleinizirani ekstrakt podvrgava se ekstrakciji s acetonitrilom pri sobnoj temperaturi. Uparavanjem acetonitrilnog ekstrakta dobiva se materijal koji se mora dodatno pročititi ekstrakcijom s diklormetanom a produkt, silimarin dobiva se reotapanjem ostatka u minimalnoj količini acetonitrila te uz precipitaciju dodatkom destilirane vode.
- 20
- 25 Opisani postupak u sklopu dokumenta uključuje neprihvatljivo prethlađenje plodova sikavice na -20°C prije deoleinizacije. Opisana ekstrakcija deoleiniziranog materijala uključuje potrošak od oko 890 ml acetonitrila na 100 g sikavice (omjer 1 : 8,9, m/V) što je prilično neprihvatljivo za industrijsku skalu. Osim toga acetonitril je znatno toksičan. Uparavanjem acetonitrilnog ekstrakta dobiva se takav materijal koji očito sadrži još nešto ulja te ga je nužno bilo potrebno prati s diklormetanom. Diklormetan je loš izbor otapala za navedenu svrhu jer je znatno toksičan i jer ima nisko vrelište što rezultira velikim gubitcima pri radu na industrijskoj skali. Pročišćavanje silimarina precipitacijom s vodom iz acetonitrilske otopine može biti problematično jer može izlučiti produkt dobre čistoće i boje ali smolaste konzistencije.
- 30
- 35 Postupak opisan u sklopu dokumenta US 4 368 195 kao i mnoge inačice istog u većoj je mjeri ispitan u laboratoriju jer je pretpostavljeno da je etilacetat pogodnije otapalo od acetonitrila zbog niže cijene i toksičnosti. Postupak uključuje deoleinizaciju plodova sikavice hladnim prešanjem. Tako deoleinizirani materijal podvrgava se višestrukoj (3x) ekstrakciji u vrućem etilacetatu. Dobiveni etilacetatni ekstrakt se uparava, a uparni ostatak prerađuje trokomponentnom ekstrakcijom voda/metanol/diklormetan (kloroform) pri čemu zaostalo ulje prelazi u diklormetanski sloj a silimarin u vodeno-metanolni sloj. Uparavanjem vodeno metanolnog sloja dobiva se sirovi produkt koji se dodatno pročišćava precipitacijom iz metanolne otopine dodatkom destilirane vode.
- 40
- 45 Opisani postupak uključuje hladno prešanje plodova sikavice što ima svojih tehnoloških prednosti, međutim, znatan dio ulja ostaje u materijalu tako da etilacetatni ekstrakt sadrži uz silimarin i puno ulja koje se jedino može ukloniti trokomponentnom ekstrakcijom. Nadalje postupak zahtjeva upotrebu velikih volumena etilacetata po masi sikavice 3x 1 : 10 m/V što je za industrijsku skalu apsolutno nenekonomično. Nadalje trokomponentna ekstrakcija zahtjeva primjenu velikih količina toksičnih organskih otapala, diklormetana i metanola, čiji je stupanj regeneracije upitan. Nadalje silimarin zaostaje u vodeno-metanolnom sloju za čije je uparavanje potrebno relativno mnogo energije pri čemu je upitna stabilnost otopljenog silimarina u završnoj fazi uparavanja kad je supstancija izložena relativno visokim temperaturama u vodenom mediju u kojem je topljivost kisika iz zraka daleko veća od topljivosti u organskim otapalima. Dodatno pročišćavanje silimarina precipitacijom iz metanolne otopine dodatkom destilirane vode može biti problematično kao i u prethodnom postupku jer se produkt može izlučiti u smolastoj konzistenciji.
- 50
- Zaključeno je da oba navedena postupka nisu (barem u opisanoj formi) pogodna za industrijsku izolaciju silimarina iz plodova sikavice.
- 55
- Razvijen je novi postupak izolacije silimarina i ulja sikavice iz plodova sikavice. Postupak uključuje mljevenje sikavice, ekstrakciju ulja sikavice s vrućim sredstvom za deoleinizaciju te ekstrakcija deoleinizirane sikavice s otapalom srednje polarnosti. Nakon filtracije ekstrakt se uparava do suha, a uparni ostatak se azeotropno suši dodatkom sredstva za sušenje. Suhi ekstrakt digerira se u vrućem eteru pri čemu se nakon hlađenja, filtracije i sušenja dobiva koncentrat silimarina u obliku homogene žuto-narančaste kristalinične supstancije, visoke temperature tališta (ca. $140-165^{\circ}\text{C}$). Postupak daje silimarin u 2,0-2,5 % iskorištenju sa sadržajem ukupnog silimarina od 86-97% te ca. 20 % ulja sikavice računato na sirovi (nesušeni) plod.
- 60
- U usporedbi s prethodno opisanim postupcima novi postupak ne koristi toksična otapala, diklormetan, metanol ili acetonitril. Opisani postupak koristi aceton kao najmanje toksično i daleko najjeftinije srednje polarno otapalo. Postupak

je razvijen uz primjenu minimalnih (optimiranu) količina organskih otapala uz stupanj regeneracije od ca. 90-95%. U opisu postupka navedeni su svi kemijski i tehnološki detalji.

Postupak uključuje slijedeće faze:

5

Mljevenje plodova sikavice

Ekstrakcija samljevene sikavice s sredstvom za deoleinizaciju

Filtracija deoleinizirane sikavice Ekstrakcija deoleinizirane sikavice s acetonom

Filtracija ekstrahirane sikavice

10

Uparavanje acetonskog ekstrakta

Azeotropno sušenje ekstrakta s toluenom

Digeriranje (deoleinizacija) ekstrakta s diizopropileterom

Filtracija silimarina

Sušenje silimarina

15

Sirovi plod sikavice prije deoleinizacije usitnjava se u mlinovima s rotirajućim nožem uz upotrebu sita finoće do 40 mesha. Nakon toga vrši se deoleinizacija uz upotrebu sredstava za deoleinizaciju, poput ugljikovodika. U povoljnoj izvedbi izuma kao sredstvo za deoleinizaciju korišten je *n*-heksan. U drugoj izvedbi izuma korišten je petroleter. Suspenzija se u korištenom omjeru biljni materijal : otapalo (m/V) normalno može miješati mehaničkom mješalicom.

20

Filtracija se vrši pod vakuumom. Filtrat je intenzivno žute boje i sadrži ulje sikavice u *n*-heksanu. Ostatak je grijan u vakuumu radi potpunog uklanjanja tragova ekstrakcionog otapala, *n*-heksana. U navedenim uvjetima, 70 °C tijekom 2-3 h, kvalitativno i kvantitativno ne dolazi do nikakve promjene na dobivenom ulju tj. tijekom toga ne gubi na kvaliteti. Prema ovom izumu deoleinizirani plod sikavice nije potrebno sušiti od tragova adsorbiranog *n*-heksana već se odmah nakon otsisavanja podvrgava ekstrakciji s otapalom srednje polarnosti poput acetona.

25

Ekstrakcija s acetonom se vrši na temperaturi od oko 18 °C do 56 °C. Optimalno vrijeme ekstrakcije je od oko 24 h do oko 72 h ovisno o temperaturi pri kojoj se provodi ekstrakcija nakon koje slijedi filtracija. Navedeni postupak omogućava nivo regeneracije acetona od oko 95% koji se kao i *n*-heksan u fazi deoleinizacije realno troši oko 5%.

30

U drugoj izvedbi deoleinizacija se vrši u običnom perkolatoru kod sobne temperature tijekom barem 48 h. U tom slučaju nema opasnosti zbog rada na povišenim temperaturama s *n*-heksanom: Nakon deoleinizacije i cijedenja tragova *n*-heksana nastavlja se perkolacija s acetonom radi izolacije silimarina.

35

Slijedi azeotropna destilacija kojom se uklanja voda iz ostatka nakon uparavanja acetonskog filtrata. Pri tome se nakon uparavanja acetona promijeni prihvatna posuda u koju se zatim skuplja smjesa toluena i vode. Navedena se smjesa lako separira u ekstratoru pri čemu se sprema gornji, toluenski sloj. U navedenim uvjetima regenerira se oko 80% utrošenog toluena dok se jedan dio gubi u vakumskom sistemu. Rad uz vakuum je međutim nužan da bi se sušenje obavilo pri što nižoj temperaturi.

40

Za sekundarnu deoleinizaciju tj. za uklanjanje zaostalog ulja, prema izumu, kao ekstrakcijska sredstva upotrebljavaju se eteri. Prema izumu, za sekundarnu deoleinizaciju pogodni su eteri s 4 do 8°C atoma, poput tetrahidrofurana ili diizopropiletera ili dietiletera.

45

Pronađeno je da diizopropileter djeluje kao najefikasnije otapalo za deoleinizaciju ekstrakta pri čemu potpuno otapa ulje, dok komponente silimarina ostaju gotovo potpuno suspendirane. Jedan dio uparnog materijala može ostati zalijepljen za stijenke tikvice i ne skida se spontano tijekom grijanja na temperaturi povrata otapala te je bila potrebna mehanička intervencija. Na industrijskoj skali upotrebljava se reaktor s mehaničkom mješalicom čiji oblik slijedi geometriju posude da bi se izbjegli ljepljenje silimarina za stijenke još tijekom azeotropnog sušenja s toluenom. Jednom formirana suspenzija komponenata silimarina lijepo se digerira i lako se otsisava nakon hlađenja. Daljnje hlađenje suspenzije ne utječe bitno na veće iskorištenje jer je topljivost komponenata silimarina u diizopropileteru zanemariva.

50

Slijedeći primjer služi samo za ilustraciju izuma i nikako ne služi u svrhu definiranja opsega i sadržaja izuma:

55

Primjer

U troglu tikvicu od 2000 ml odvagano je 400.00 g usitnjenih plodova sikavice i dolijevano 1200 ml *n*-heksana (ca. 96%-tni, Merck, za sintezu). Dobivena suspenzija zagrijana je uz miješanje mehaničkom mješalicom te uz povratno hladilo sa sobne temperature, ca. 22-23 °C do temperature povrata otapala, ca. 63 °C tijekom 30 minuta. Suspenzija je miješana pri temperaturi povrata otapala, ca. 62-63 °C, tijekom 3 h. Nakon toga smjesa je ohlađena, biljni materijal otsisan preko Buchnerovog lijevka uz podtlak. Za prebacivanje i ispiranje tikvice utrošeno je 2x100 ml *n*-heksana dok je za ispiranje otsisanog biljnog materijala utrošeno još 2x100 ml *n*-heksana. Iz filtrata je predestilirano i na taj način

60

regenerirano ca. 1500 ml (oko 95% ukupno utrošenog) *n*-heksana dok je ostatno žućkasto ulje grijano pri 70 °C u vakuumu pri 8-10 mbara tijekom 2 h.

Dobiveno je bistro žuto narančasto ulje slabog karakterističnog mirisa:

- ŠARŽA-1: 60.05 g (15.0%, računato na sirovi plod)
- ŠARŽA-2: 61.41 g (15.4%, računato na sirovi plod)
- ŠARŽA-3: 61.98 g (15.5%, računato na sirovi plod)

Deoleinizirani plod sikavice (ca. 340 g) prebačen je u troglu tikvicu od 2000 ml i dolijano 1200 ml acetona, a dobivena suspenzija miješana mehaničkom mješalicom pri sobnoj temperaturi tijekom 72 h. Nakon toga suspendirani biljni materijal otsisan je preko Buchnerovog ljevka uz podtlak. Za prebacivanje ostataka biljnog materijala utrošeno je 2x100 ml acetona te još 2x100 ml acetona za dodatno ispiranje biljnog materijala.¹⁰ Iz dobivenog žutog filtrata (ca. 1550-1580 ml) aceton je predestilirao destilacijom kod atmosferskog tlaka pri čemu je regenerirano ca. 1500-1530 ml (93.8-95.6%) od ukupno utrošene količine.

Ostatku je dodano 60 ml toluena i upareno na rotacionom uparivaču pri 80-85 °C i tlaku od 50-60 mbara pri čemu je dobiveno 25-27 g (6.25-6.75 g) suhog ekstrakta u obliku žuto narančastih kristala prožetih s žuto narančastim uljem. Suhom ekstraktu dodano je 50 ml diizopropiletera i uz miješanje zagrijano do temperature povrata otapala, ca. 67-69 °C tijekom 25-30 minuta. Suspenzija je grijana uz miješanje u vrijućem diizopropileteru tijekom još 30 minuta. Nakon toga suspenzija je ohlađena do sobne temperature tijekom ca. 1 h. Zatim su kristali otsisani i isprani s 2x25 ml diizopropiletera. Produkt je sušen u vakuum sušnici pri 40 °C i tlaku od 8-10 mbara tijekom 24 h.

Dobiven je silimarina (1) u obliku žutih do svjetlo narančastih sjajnih kristalica:

- ŠARŽA-1: 8.52 g (2.13%), t. t. 142.2-165.0 °C
- ŠARŽA-2: 9.02 g (2.26%), t. t. 143.0-164.2 °C
- ŠARŽA-3: 8.91 g (2.23%), t. t. 140.2-161.1 °C

Iz žutog diizopropileterskog filtrata nakon filtracije silimarina (ca. 100 ml) destilacijom kod atmosferskog tlaka regenerirano je 95-96 ml (95-96%) diizopropiletera. Ostatak je sušen u vakuumu pri 8-10 mbar uz grijanje na 70 °C tijekom 2 h pri čemu je dobiveno sekundarno žuto narančasto ulje koje se mora dodatno profilirati od tragova (manje od 1%) suspendiranih u diizopropileteru topljivih spojeva iz ekstrakta.

- ŠARŽA-1: 17.84 g (4.46%, računato na sirovi plod)
- ŠARŽA-2: 17.23 g (4.31%, računato na sirovi plod)
- ŠARŽA-3: 18.70 g (4.68%, računato na sirovi plod)

Ukupno dobiveno ulje: (primarno + sekundarno)

- ŠARŽA-1: 77.89 g (19.5%, računato na sirovi plod)
- ŠARŽA-2: 78.64 g (19.7%, računato na sirovi plod)
- ŠARŽA-3: 80.86 g (20.2%, računato na sirovi plod)

Navedeni su optimalni uvjeti sušenja silimarina. Silimarina je zbog svojih fenolnih komponenti osjetljiv na kisik i svjetlo. Navedeni postupak omogućava uspješno sušenje silimarina jer nakon otsisavanja sadrži samo adsorbirani diizopropileter koji se izuzetno lako suši.

Diizopropileter, aceton i *n*-heksan regeneriraju se u ca. 95% iskorištenju i mogu se ponovno upotrijebiti za istu svrhu. Komercijalni diizopropileter stabiliziran je s ca. 50 ppm antioksidansa, poput 2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenola (BHT), međutim, nakon destilacije regenerirano otapalo ne sadrži više stabilizator. U slučaju česte opetovane primjene istog diizopropiletera, otapalo se bez problema može takvo koristiti uz kraće skladištenje u dobro zatvorenim bačvama. Za dulje skladištenje u regenerirano otapalo treba dodati BHT (jeftin), oko 5 g na 100 l.

Silimarina-dobiven opisanom postupkom kristalinična je tvar narandžaste boje, bez mirisa, tali se u temperaturnom intervalu između 140 i 165 °C.

U IR-spektaru silimarina vidljiva je karakteristična vrpca istezanja alkoholnih i fenolnih O-H veza pri 3400 te vrpca istezanja ketonske C=O veze oko 1640 cm⁻¹.

IR (KBr) v: 3401 (O-H, fenolna skupina), 2928, 1745, 1641 (C=O, keto-skupina), 1513, 1465, 1358, 1275, 1160, 1160, 1083, 1027, 992, 813, 782, 644 cm^{-1} .

U IR-spektu ulja sikavice pojavljuje se vrpca na oko 1744 cm^{-1} karakteristična za istežanje esterske C=O veze

IR (film) v: 3009, 2926, 2855, 1744 (C=O, esterska skupina), 1656, 1466, 1418, 1378, 1239, 1163, 1099, 914, 723 cm^{-1} .

Na dobivenom silimarinu izvršena su kvalitativna (IR spektar, tankoslojna kromatografija) i kvantitativna (spektrofotometrijska) ispitivanja.

Kvantitativna analiza silimarina koncentrata dobivenog opisanim postupkom rađena je spektrofotometrijski upotrebom 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) kao reagensa po metodi opisanoj u literaturi (H. Wagner, P. Diesel, M. Seitz, *Arzneim. Forsch. (Drug Res.)* 24 (1974) 466-471). Rezultati su prikazani u tablici 1.

Tablica 1. Rezultati kvantitativnog sadržaja ukupnog silimarina u uzorcima silimarina, šarže 1,2 i 3 dobivenih prema opisanom postupku.

UZORAK	Odvaga (g)	Izmjerena apsorbancija	Izračunata apsorbancija za 50.00 mg sups.	UKUPNI SILIMARIN ¹ (%)
Silibin-stand. ²	0.05044	0.237	0.235	100
Silimarin, Š-1	0.05043	0.214	0.212	90.21
Silimarin, Š-2	0.05002	0.203	0.203	86.38
Silimarin, Š-3	0.05010	0.227	0.227	96.60

¹ Sadržaj ukupnog silimarina predstavlja sadržaj ukupnih ketona tj. svih komponenata silimarina s ketonskom funkcionalnošću (tzv. DNPH pozitivnih spojeva).

² Standard silibina pripremljen preparativnom kromatografijom, proglašen kao 100%-tni silimarin.

LITERATURA:

The Merck Index, 12 th Edition, Merck & Co., New York (1996) 1464.

H. M. Rauen, H. Schriewer, *Arzneim. Forsch. (Drug Res.)* 23 (1973) 148-170.

R. Seeger, G. Beck, K. Gretzer, A. Heim, *Arzneim. Forsch. (Drug Res.)* 24 (1974) 868-873.

G. Hahn, H. D. Lehmann, M. Kurten, H. Uebel, G. Vogel, I. Baumann, I. Dobberstein, E. Eisen, A. Ersfeld, S. Kruger, E. Meier, H. Walther, *Arzneim. Forsch. (Drug Res.)* 18 (1968) 698-704.

H. Wagner, L. Horhammer, R. Munster, *Arzneim. Forsch. (Drug Res.)* 18 (1968) 688-696.

G. Halbach, W. Trost, *Arzneim. Forsch. (Drug Res.)* 24 (1974) 866-868.

A. Pelter, *Tetrahedron Lett.*, 25 (1968) 2911-2916.

L. Merlini, A. Zanarotti, A. Pelter, M. P. Rochefort, R. Hansel, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* (1980) 775-778.

L. Merlini, A. Zanarotti, A. Pelter, M. P. Rochefort, R. Hansel, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* (1979) 695.

R. Hansel, G. Schopflin, *Tetrahedron Lett.*, 37 (1967) 3645-3648.

Kahol et al., *US Pat.* 6,309,678 (2001).

Madaus et al., *US Pat.* 4,368,195 (1983).

H. Wagner, P. Diesel, M. Seitz, *Arzneim. Forsch. (Drug Res.)* 24 (1974) 466-471.

H. Wagner, S. Bladt, *Plant Drug Analysis*, Springer Verlag (1996) 234-235.

PATENTNI ZAHTEVI

1. Postupak izolacije silimarina iz sjemena biljke sikavice (*Silybum marianum*) u kojem se sjeme biljke sikavice melje bez prethodnog hlađenja nakon čega slijedi deoleinizacija s ugljikovodičnim otapalom, **naznačen time da uključuje** slijedeće korake:
 5 Mljevenje sjemena u fini prah
 Deoleinizaciju samljevenog sjemena s ugljikovodičnim otapalom
 Ekstrakciju deoleiniziranog sjemena s otapalom srednje polarnosti na temperaturi od 18 do 56 °C da bi se dobio silimarinski ekstrakt
 10 Uparavanje ekstrakta iz koraka c)
 Uklanjanje vode iz uparnog ostatka iz koraka d)
 Pročišćavanje suhog ekstrakta iz prethodnog koraka od zaostalog ulja
 Odijeljivanja, ispiranja i sušenja dobivenih kristala
2. Postupak izolacije silimarina iz sjemena biljke sikavice (*Silybum marianum*) prema zahtjevu 1, **naznačen time da** se mljevenje sjemena odvija u mlinu s rotirajućim noževima sa sitom do 40 mesha.
3. Postupak izolacije silimarina iz sjemena biljke sikavice (*Silybum marianum*) prema zahtjevu 1, **naznačen time da** se samljeveno sjeme prebaci u reaktor s mehaničkom miješalicom čiji oblik slijedi geometriju posude reaktora.
4. Postupak izolacije silimarina iz sjemena biljke sikavice (*Silybum marianum*) prema zahtjevu 1 i 3, **naznačen time da** se deoleinizaciju vrši u ekstraktoru na temperaturi povrata otapala.
- 20 5. Postupak izolacije silimarina iz sjemena biljke sikavice (*Silybum marianum*) prema zahtjevu 1, **naznačen time da** se deoleinizaciju vrši u perkulatoru na sobnoj temperaturi.
6. Postupak izolacije silimarina iz sjemena biljke sikavice (*Silybum marianum*) prema zahtjevu 3, **naznačen time da** se kao otapala za deoleinizaciju koriste *n*-heksan ili petroleter.
7. Postupak izolacije silimarina iz sjemena biljke sikavice (*Silybum marianum*) prema zahtjevu 5, **naznačen time da** se kao otapala za deoleinizaciju koriste *n*-heksan.
- 25 8. Postupak izolacije silimarina iz sjemena biljke sikavice (*Silybum marianum*) prema zahtjevu 6, **naznačen time da** omjer između sjemena biljke sikavice i *n*-heksana iznosi 1:2 do 1:5 m/V.
9. Postupak izolacije silimarina iz sjemena biljke sikavice (*Silybum marianum*) prema zahtjevu 6, **naznačen time da** omjer između sjemena biljke sikavice i *n*-heksana iznosi 1:3 m/V.
- 30 10. Postupak izolacije silimarina iz sjemena biljke sikavice (*Silybum marianum*) prema zahtjevu 1, **naznačen time da** se za ekstrakciju deoleiniziranog sjemena kao srednje polarno otapalo koristi aceton.
11. Postupak izolacije silimarina iz sjemena biljke sikavice (*Silybum marianum*) prema zahtjevu 3 i 7, **naznačen time da** se ekstrakcija deoleiniziranog sjemena odvija u ekstraktoru kroz 24 sata oko temperature povrata acetona.
12. Postupak izolacije silimarina iz sjemena biljke sikavice (*Silybum marianum*) prema zahtjevu 7, **naznačen time da** se ekstrakcija deoleiniziranog sjemena odvija u perkulatoru kroz 72 sata na sobnoj temperaturi.
- 35 13. Postupak izolacije silimarina iz sjemena biljke sikavice (*Silybum marianum*) prema zahtjevu 7, **naznačen time da** omjer između sjemena biljke sikavice i acetona iznosi 1:2 do 1:5 m/V.
14. Postupak izolacije silimarina iz sjemena biljke sikavice (*Silybum marianum*) prema zahtjevu 7, **naznačen time da** omjer između sjemena biljke sikavice i acetona iznosi 1:3 m/V.
- 40 15. Postupak izolacije silimarina iz sjemena biljke sikavice (*Silybum marianum*) prema zahtjevu 1, **naznačen time da** se uparni acetonski ostatak suši azeotropnom destilacijom s toluenom.
16. Postupak izolacije silimarina iz sjemena biljke sikavice (*Silybum marianum*) prema zahtjevu 1, **naznačen time da** se pročišćavanje suhog ekstrakta iz zahtjeva 10 vrši eterima s 4 do 8 C atoma
17. Postupak izolacije silimarina iz sjemena biljke sikavice (*Silybum marianum*) prema zahtjevu 11, **naznačen time da** se pročišćavanje silimarina odvija oko temperature vrenja upotrebljenog etera.
- 45 18. Postupak izolacije silimarina iz sjemena biljke sikavice (*Silybum marianum*) prema zahtjevu 11, **naznačen time da** se pročišćavanje suhog ekstrakta vrši s tetrahidrofuranom, diizopropileterom ili dietileterom.
19. Postupak izolacije silimarina iz sjemena biljke sikavice (*Silybum marianum*) prema zahtjevu 12 **naznačen time da** se pročišćavanje suhog ekstrakta vrši s diizopropileterom na temperaturi od oko 67 do oko 69 °C kroz oko 25 do oko 30 minuta.
- 50 20. Postupak izolacije silimarina iz sjemena biljke sikavice (*Silybum marianum*) prema zahtjevu 13 **naznačen time da** se suspenzija hladi do sobne temperature kroz oko 1 sat.
21. Postupak izolacije silimarina iz sjemena biljke sikavice (*Silybum marianum*) prema zahtjevu 1, **naznačen time da** se kristali pročišćenog silimarina odfiltriraju i nekoliko puta isperu s diizopropileterom.
- 55 22. Postupak izolacije silimarina iz sjemena biljke sikavice (*Silybum marianum*) prema zahtjevu 1, **naznačen time da** se produkt suši u sušionici.
23. Postupak izolacije silimarina iz sjemena biljke sikavice (*Silybum marianum*) prema zahtjevu 16, **naznačen time da** se produkt suši u sušionici na povišenoj temperaturi i sniženom tlaku.
- 60 24. Postupak izolacije silimarina iz sjemena biljke sikavice (*Silybum marianum*) prema zahtjevu 17, **naznačen time da** se produkt suši u sušionici na 40 °C i tlaku od oko 8 do oko 10 mbar.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.